动 物 学 研 究 2011, Oct. 32(5): 492−498 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI: 10.3724/SP.J.1141.2011.05492

香鱼凝血因子 X 基因表达与鳗利斯顿氏菌感染的相关性

黄左安, 陈 炯*, 陆新江, 史雨红, 李明云

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 凝血途径的关键因子——凝血因子 X (coagulation factor X, FX), 是一种与免疫调控密切相关的维生素 K 依赖型丝氨酸蛋白酶。该研究克隆了香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) FX 基因全长 cDNA 序列, 它由 1 817 个核苷酸组成, 包含一个大的开放阅读框, 编码一个由 453 个氨基酸组成的相对分子质量为 5.07 × 10^4 的蛋白。香鱼 FX 与已知的哺乳动物 FX 的结构相似, N 端 24 个残基为信号肽序列。序列比较表明, 香鱼 FX 与斑马鱼 FX 的氨基酸同一性最高, 为 53%。在健康香鱼中, FX 基因 mRNA 主要在肝组织中表达, 脑和鳃中也有少量表达。实时荧光定量 PCR 分析揭示, 鳗利斯顿氏菌感染后香鱼肝组织中 FX 基因 mRNA 表达显著上调, 16 h 时达到 5.43 倍。通过原核表达系统表达了香鱼 FX 丝氨酸蛋白酶结构域, 并制备了抗血清。Western blotting 分析显示, 鳗利斯顿氏菌感染后香鱼血清中 FX 含量显著增加, 并随着时间延长上调倍数不断增大, 在 36 h 时达到 3.68 倍。据此, FX 基因 mRNA 及蛋白的表达与鳗利斯顿氏菌感染香鱼的过程紧密相关, 揭示它可能在鱼类抗细菌感染的免疫反应中起重要作用。

关键词: 凝血因子 X; 香鱼; 鳗利斯顿氏菌; 实时荧光定量 PCR; Western blotting
中图分类号: Q917.4; Q959.499 **文献标志码**: A **文章编号**: 0254-5853-(2011)05-0492-07

Alteration on the expression of ayu coagulation factor X gene upon *Listonella anguillarum* infection

HUANG Zuo-An, CHEN Jiong*, LU Xin-Jiang, SHI Yu-Hong, LI Ming-Yun

(*Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology*, *Ministry of Education*, *Ningbo University*, *Ningbo*, 315211 *China*)

Abstract: Coagulation factor X (FX) plays an important role in the immune response of mammals. In this study, the full length cDNA sequence of the ayu FX gene, 1817 bp in length excluding 3'-polyA tail, was determined for the first time. The sequence contained an open reading frame, which encoded a protein of 453 amino acids with a molecular weight of 5.07 × 10^4. The predicted protein had motifs typical of animal FX, and its N-terminal 24 residues were the signal peptides. Sequence comparison showed that ayu FX shared 53% amino acid sequence identity with zebrafish FX. In healthy ayu, FX mRNA was expressed mainly in the liver and weakly in the brain and gill. After *Listonella anguillarum* infection, liver FX transcriptions significantly increased, and peaked at 16 h post infection. The serine protease motif of ayu FX was expressed in *Escherichia coli* and was subsequently used for antiserum preparation. Western blotting analysis revealed that serum FX significantly increased in bacterially infected ayu fish. In conclusion, the ayu FX gene expression was significant in the progress of bacterial infection, which suggests FX's role in fish immune response.

Key words: Coagulation factor FX; Ayu; *Listonella anguillarum*; RT-qPCR; Western blotting

凝血因子 X (coagulation factor X, FX) 是动物内源性和外源性凝血途径共同通路的关键酶 (Krupiczojc et al, 2008)。在机体受伤出血时, FX 被激活转变为 FXa, 能与 FVa、Ca^{2+}、磷脂共同作用将凝血酶原转化为凝血酶, 从而发挥凝血效应 (Borensztajn et al, 2008)。此外, FX 在免疫方面发挥

收稿日期:2011-05-09; 接受日期:2011-07-08
基金项目:长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0734); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0928); 宁波市自然科学基金项目(2010A610001)
*通讯作者(Corresponding author), Tel: 0574-87609571, E-mail: jchen1975@163.com
第一作者简介:黄左安(1988—), 男, 浙江温州人, 硕士生, 研究方向:水产分子生物学; Tel: 13958231636; E-mail: hzaok@163.com

着非常重要的作用。FXa 能激活蛋白酶激活受体-1 (PAR-1)和蛋白酶激活受体-2 (PAR-2), 参与免疫调控维持机体免受病原体侵害 (Schoenmakers et al, 2005; Borensztajn & Spek, 2011); FXa 能诱导人脐静脉内皮细胞白介素-6 (IL-6) 和促炎细胞因子巨噬细胞迁移抑制因子(MIF) 的表达, 与炎症反应相关 (Cirino et al, 1997; Papapetropoulos et al, 1998; Shimizu et al, 2004); FX 参与补体系统功能中心 C3 的激活, 从而参与补体系统涉及的免疫过程 (Amara et al, 2008)。近年来, 哺乳类、鸟类、爬行类、鱼类等多个物种的 FX 基因序列已被测定 (Pendurthi et al, 1997; Heidtmann & Kontermann, 1998; St Pierre et al, 2005; Kimura et al, 2009; Jima et al, 2009; Leong et al, 2010)。

香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 隶属胡瓜鱼目香鱼科, 是东亚地区中国、日本和朝鲜等国家特有的一种小型经济名贵鱼类。高密度人工养殖导致病害频繁发生, 其中鳗利斯顿氏菌 (*Listonella anguillarum*) 是养殖香鱼的主要病原菌之一, 造成巨大的经济损失 (Li et al, 2009)。人工养殖香鱼以无污染和绿色健康为特色, 抗生素和农药防治病害受到诸多限制。因此, 迫切需要深入研究香鱼免疫相关基因来指导香鱼病害防治 (Uenobe et al, 2007; Chen et al, 2008)。由于 FX 基因在动物免疫反应中起重要作用, 我们拟对其进行研究。本实验通过文库随机测序结合 cDNA 末端快速扩增 (RACE)的方法成功获得香鱼 FX 基因的 cDNA 全序列, 明确了它的序列特征、系统进化关系和 mRNA 的组织表达特征, 并原核表达制备了抗血清, 随后分别用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blotting 研究了鳗利斯顿氏菌侵染后香鱼肝组织 FX 基因 mRNA 和血清 FX 蛋白的表达变化, 为进一步深入研究 FX 在鱼类抗细菌免疫中的作用奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料与试剂

健康香鱼个体体重 20～25g, 购自宁波水产大世界。大肠杆菌 TG1 菌株和载体 pBluescript SKII (+) 由本实验室保存。RNAiso 试剂、Oligotex-dT30<super> mRNA_Purification Kit、AMV 逆转录酶、*Ex Taq* DNA 聚合酶、T_4 DNA 连接酶、cDNA Library Construction Kit 和 SYBR *Premix Ex Taq* 试剂盒均购自 Takara 公司; Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司; 引物合成及序列测定由上海英骏生物工程公司完成; 二抗 (辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG) 购自北京中山金桥生物技术有限公司; ECL 化学发光试剂盒、显影定影试剂盒、柯达 X-OMAT BT 胶片和压片暗盒购自碧云天生物技术研究所。ICR 小鼠购自宁波大学医学院实验动物中心。鳗利斯顿氏菌香鱼分离株 ayu-H080701 由本实验室保存。

1.2　香鱼 FX 基因 cDNA 序列的获得

提取健康香鱼肝脏总 RNA, 经 1%(W/V)琼脂糖凝胶电泳检测完整性, 紫外分光光度计进行纯度分析。用 Oligotex-dT^{30}纯化 mRNA, 以其为模板, 采用 cDNA Library Construction Kit 构建香鱼肝 cDNA 文库, 具体方法参照厂家说明。随机挑取 287 个插入片段≥800 bp 的克隆进行序列测定。将获得的 cDNA 序列通过 BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)与 GenBank 中的序列进行比较分析, 筛选与已知物种 FX 基因相似的部分序列, 并用 RACE 技术获得香鱼 FX 全长 cDNA 序列。

1.3　序列分析

信号肽序列预测采用 SignalP 3.0 系统 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), 多重序列比对采用 ClustalW 程序 (http://clustalw.ddbj.nig. ac.jp/), 系统进化树构建采用 MEGA 4.0 (Tamura et al, 2007)。

1.4　香鱼 FX 基因 mRNA 的组织表达特征分析

采用 RNAiso 试剂提取香鱼各组织总 RNA, 并用 DNase I (RNase-free) 进行处理。取 1 μg 总 RNA 为模板, oligo (dT)30 为引物, 用 AMV 逆转录酶在 42 ℃作用 1.5 h, 合成第一链 cDNA。根据已获得的香鱼 FX 基因 cDNA 序列设计引物, FXtest (+): 5′-*CCACCCACTTCAAAGTATGCC*-3′和 FXtest (−):5′-*TGACATGGGTGAGAGCAGCA*-3′, 预期扩增片段长度为 386 bp; 根据香鱼看家基因 β-actin cDNA 序列 (AB020884) 设计引物, pActin2 (+): 5′-*TCGTGCGTGACATCAAGGAG*-3′和 pActin2 (−): 5′-*CGCACTTCATGATGCTGTTG*-3′, 预期扩增片段长度为 231 bp。PCR 反应体系为 25 μL, 包括 cDNA 模板 0.5 μL, 10× Ex PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTP 混合物 (各 2.5 mmol/L) 2 μL, 正向和反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, Ex Taq DNA 聚合酶(5U/μL) 0.25 μL 和灭菌水 17.75 μL。PCR 反应条件为: 94 ℃预变性; 2 min 后按下列程序进行 30 个循环, 每个循环包括 94 ℃变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s; 循环结束后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 2%(W/V)琼脂糖

凝胶电泳检测。

1.5 鳗利斯顿氏菌侵染的香鱼肝 FX 基因 mRNA 表达变化

取鳗利斯顿氏菌感染后不同时间香鱼肝组织, 检测FX基因mRNA转录水平的变化。参照RNAiso操作说明书, 对每组的5条香鱼肝组织总RNA进行提取, 并将同一组的 RNA 进行等量混合。第一链cDNA合成, RT-qPCR的引物序列同1.4。25 μL PCR的反应体系包括 SYBR *Premix Ex Taq* (2×) 缓冲液12.5 μL、引物各1 μL、模板0.5 μL、灭菌水10 μL。扩增反应在Stratagene Mx3000P荧光定量PCR仪上进行, 程序为94 ℃ 180 s (1个循环), 随后进入扩增阶段, 共40个循环, 每一循环包括: 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s。为确保特异性扩增, PCR结束后对扩增产物进行熔解曲线分析, 条件是94 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 95 ℃ 30 s (1个循环)。为保证PCR结果的准确性, 每一个样品重复分析 3 次, 包括目标基因(FX)和看家基因 (β-actin)。荧光定量的结果采用仪器自带程序 MxPro 3.2 读取。根据 Livak & Schmittgen (2001)提出的相对标准曲线法$2^{-\Delta\Delta Ct}$对相对定量的结果进行分析, 获得香鱼肝组织 FX 基因mRNA的相对表达量。

1.6 香鱼 FX 的原核表达和抗血清制备

由于香鱼 FX 全长基因在 pET28a、pET22b、pET15b、pSBET等载体中均不表达。因此, 我们选择性表达香鱼 FX 丝氨酸蛋白酶结构域。设计引物对 pET-FX (+): 5′-*C<u>CATATG</u>ATCCAAATCCATAAGATCTATAT*-3′和 pET-FX (-): 5′-*<u>GGGATCC</u>TCAAGGTTGGGGATAAACAGCA*-3′ (下划线为添加的限制性内切酶 *Nde* I和 *Bam* H I的识别序列), 以cDNA为模板PCR扩增获得目的片段, 扩增产物经1% (w/v)琼脂糖凝胶电泳分离后, 用QIAquick Gel Extraction纯化。纯化产物用 *Nde* I和 *Bam* H I双酶切后, 插入到同样双酶切的原核表达载体 pSBET 中, 获得重组质粒pSBET-FX。pSBET-FX转化大肠杆菌BL21 pLys E 菌株, IPTG 诱导表达, 细菌裂解产物经SDS-PAGE电泳分离, 考马斯亮蓝 G-250 染色检测表达情况。

重组菌体大量诱导后, 经 12% SDS-PAGE 和5%～20%梯度SDS-PAGE两次分离, 用0.25 mol/L KCl染色后, 切下目的条带用以免疫小鼠。共免疫3次, 每次间隔一周。于第3次免疫后的第3天眼动脉取血, 4 ℃静置4 h以上, 冷冻离心后取上清, 分装后保存于−70 ℃备用。

1.7 Western blotting 检测

香鱼尾静脉抽取血浆后于 4 ℃静置 4 h, 冷冻离心取上清, 将上清样品用 Bradford 法定量(Bradford, 1976)。0 h对照、4、8、12、16、24和36 h的血清蛋白样品经5%浓缩胶 (100 V, 1 h) 和12%分离胶 (130 V, 2 h) 电泳, 将凝胶放置于等面积的已润湿的 NC 膜上, 然后夹在滤纸中, 滤纸上下各三层, 湿转法35 V转移3 h。转膜结束后, 用10%脱脂奶粉的 PBS-T 37 ℃封闭 2 h。随后一抗4 ℃孵育过夜, 一抗用 5%BSA 和 0.02%叠氮钠的PBS-T稀释。一抗结束后, 将NC膜用PBS-T 15 min洗一次, 5 min三次。然后加入相应的辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG (用PBS-T 1∶5 000稀释), 37 ℃温浴1 h。再用PBS-T 15 min洗一次, 5 min四次, 加上ECL于暗室显影。条带用Quantity One软件进行灰度值计算。

2 结 果

2.1 香鱼 FX 基因 cDNA 序列分析

287 个随机挑选的克隆中共筛选到 8 个阳性克隆, 经测序分析, 与已知其他动物 FX 基因具有较高的同源性, 且这些序列彼此间同源性>99%。随即用RACE方法获得了香鱼FX基因全长cDNA序列 (EMBL登录号: FR851398)。它由1 817个核苷酸组成, 3′-末端具有*poly* (A) 尾, 含一个大的开放阅读框, 起始于第234～236 位的*ATG*起始密码子, 终止于第1 593～1 595位的*TGA*终止密码子, 推测编码一个由 453 个氨基酸组成、相对分子质量为 5.07 × 104 的蛋白。分析表明, 序列的3′-端非编码区长222个核苷酸, 多腺苷酸化信号序列“*AATAAA*”位于第1 801～1 806位 (图1)。香鱼FX的N端24个氨基酸为信号肽序列, 其氨基酸序列还包括γ-羧基谷氨酸结构域 (Ala 43～Val 88)、两个EGF-like结构域 (Asp 89～Glu 125、Ser 129～Cys 167) 和丝氨酸蛋白酶结构域 (Glu 190～Lys 437) 三种保守的结构域, 其中γ-羧基谷氨酸结构域中包含10个保守的γ-羧基谷氨酸。

全长氨基酸序列比较表明, 香鱼 FX 与斑马鱼FX同一性最高, 为53%, 与大西洋鲑FX的同一性为48%, 而与哺乳动物FX的同一性为44%～46%。系统进化树分析表明, 鱼类、哺乳动物、鸟类和爬行类FX分别成簇 (图2)。

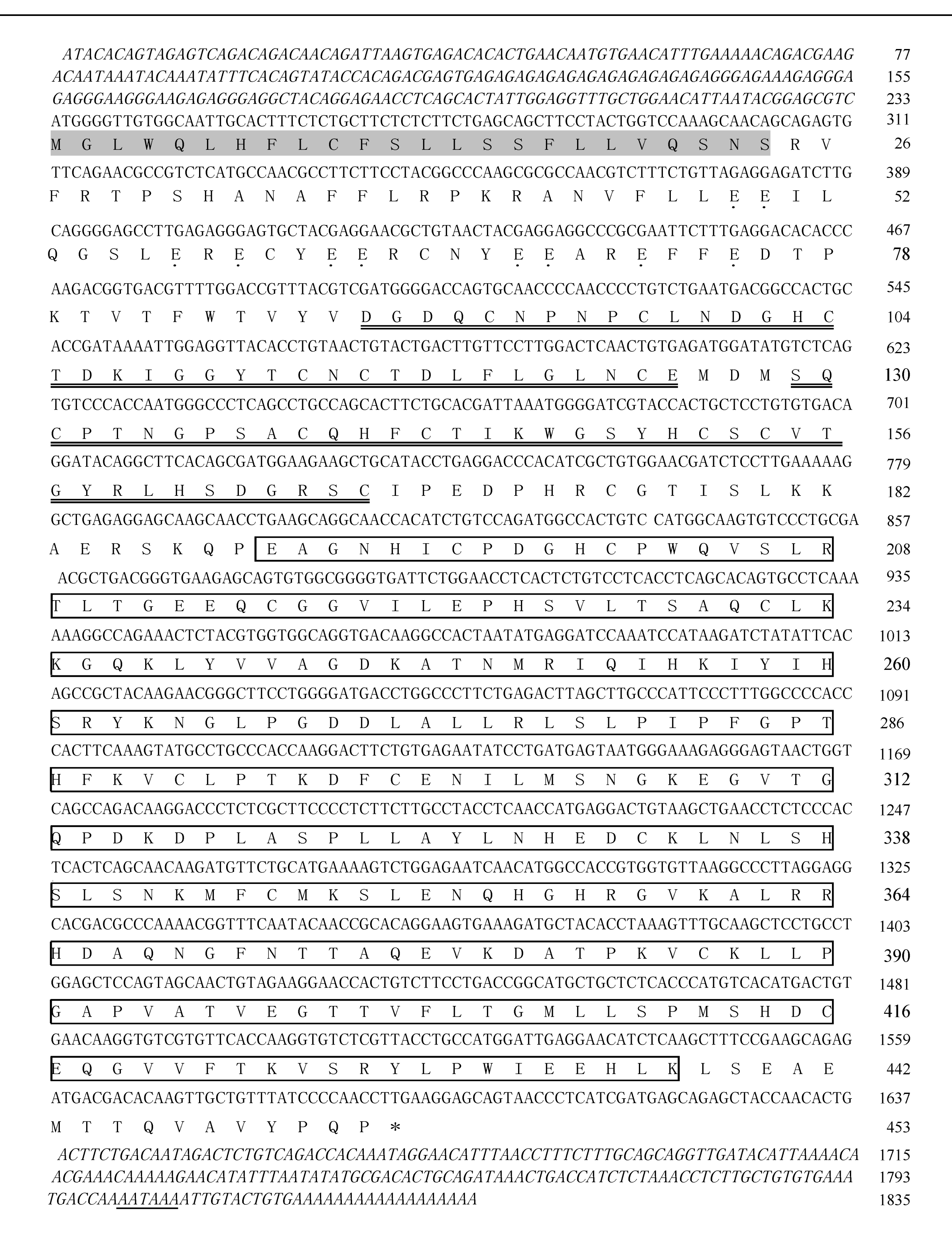


图 1　香鱼 FX 基因 cDNA 核苷酸序列和预测的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide sequences of ayu FX cDNA and deduced amino acid sequences

5'端非编码区和 3'端非编码区以斜体字母标出，正体部分为编码区，上面为核苷酸序列，下面为氨基酸序列，*表示终止子；阴影部分为信号肽序列，多聚腺苷酸加尾信号 (AATAAA) 用单下划线标出；加粗字体为γ-羧基谷氨酸结构域，其中保守的γ-羧基谷氨酸 (E) 以重点号（•）标出；双下划线标记的是两个 EGF-like 结构域；方框标记的为丝氨酸蛋白酶结构域。

3'-, 5'-untranslated regions are shown as italics. Coding region is shown as part, where the upper sequence indicates the nucleotides and the lower shows the amino acids. Asterisk indicates stop codon. Shaded box showes the signal peptides. Putative polyadenylation signals (AATAAA) are single underlined. Gla domain is bond printed, and 10 potential γ-carboxylated glutamic acid residues are marked by “•”. Two EGF-like domains are double underlined. Serine proteinase domain is boxed.

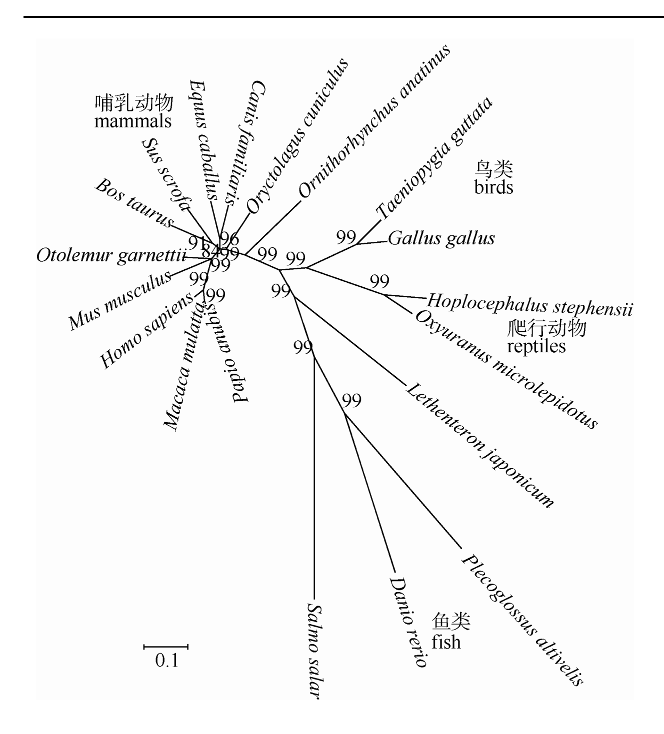


图 2 基于 NJ 法构建香鱼和其它动物全长 FX 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 FX phylogenetic tree of ayu and other animals based on NJ method

各基因 GenBank 序列号为: 香鱼; FR851398; 斑马鱼, XM_002660325; 大西洋鲑; BT059500; 七鳃鳗; AB377285; 澳洲棕蛇; DQ017705; 细鳞太攀蛇; AY940205; 鸭嘴兽; NM_001127614; 珍珠鸟; XM_002191385; 红原鸡; NM_205022; 小家鼠; NM_007972; 欧洲野兔; NM_001082016; 野猪; NM_001044592; 牛; XM_613822; 棕狒狒; DP000536; 猕猴; NM_001104584; 智人; K03194; 马; XM_001917075; 家犬; XM_534191; 小耳大婴猴; DP000880。

GenBank accession numbers: *Plecoglossus altivelis*; FR851398 ; *Danio rerio*; XM_002660325; *Salmo salar*; BT059500; *Lethenteron japonicum*; AB377285; *Pseudonaja textili;* DQ017705; *Oxyuranus microlepidotus*; AY940205; *Ornithorhynchus anatinus*; NM_001127614; *Taeniopygia guttata*; XM_002191385; *Gallus gallus*; NM_205022; *Mus musculus*; NM_007972; *Oryctolagus cuniculus*; NM_001082016; *Sus scrofa*; NM_001044592; *Bos taurus*; XM_613822; *Papio anubis*; DP000536; *Macaca mulatta*; NM_001104584; *Homo sapiens*; K03194; *Equus caballus*; XM_001917075; *Canis familiaris*; XM_534191; *Otolemur garnettii*; DP000880.

2.2 香鱼 FX 基因 mRNA 的组织表达特征

取健康香鱼肝、脾、肾、脑、心、鳃、肌肉和肠进行 RT-PCR 检测, FX 扩增产物为 386 bp, 内参 β-actin 为 231 bp。RT-PCR 结果表明, 健康香鱼 FX 基因 mRNA 主要在肝中表达, 在脑和鳃中也有微量表达 (图 3)。

2.3 鳗利斯顿氏菌侵染前后香鱼 FX 基因 mRNA 的表达变化

鳗利斯顿氏菌感染的香鱼呈现出肌肉腐烂, 肠道、鳃盖和鱼鳍基部充血发红等典型的细菌败血症症状, 而对照香鱼 (注射生理盐水) 未表现出任何异常现象。由于香鱼 FX 基因 mRNA 主要在肝中表达。因此, 我们选取鳗利斯顿氏菌感染香鱼 4、8、12、16、24 和 36 h 的肝组织, 进行 RT-qPCR 分析。结果表明, 与对照组相比, 4 h 时, 染病香鱼 FX 基因 mRNA 的表达量无明显变化; 8 h 后, 表达量显著增加 (P<0.05); 16 h 时, 表达量达到峰值 (P<0.05), 约为对照组的 5.43 倍(图 4)（ANOVA, t-test）。

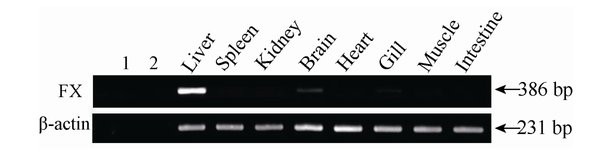


图 3 香鱼 FX 基因 mRNA 的组织表达特征

Fig.3 The mRNA expression patterns of ayu FX

FX 基因 mRNA 在健康香鱼各组织中的表达差异, 1: 香鱼基因组 DNA (DNase I 处理); 2: 无模板阴性对照

Differential expression of FX mRNA in various tissues of healthy ayu, 1: ayu genomic DNA (DNase I digested) used as template; 2: without template, used as negative control

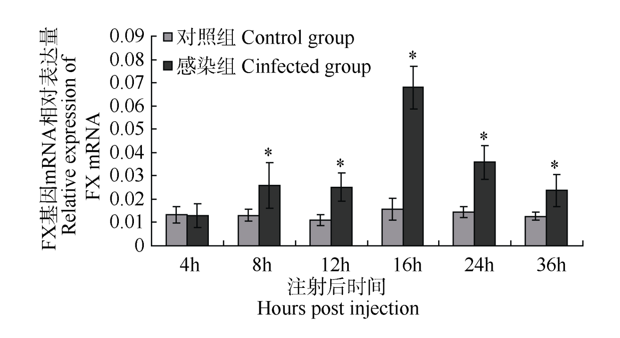


图 4 利斯顿氏菌感染前后香鱼肝组织中 FX 基因 mRNA 的表达变化

Fig. 4 Analysis of liver FX mRNA expression changes post *L anguillarum* infection in ayu.

*显著性差异（Significant differences）(n=4, P<0.05)。

2.4 香鱼 FX 基因丝氨酸蛋白酶结构域的原核表达

原核表达质粒 pSBET-FX 经测序验证无误后, 在大肠杆菌 BL21 pLys E 中经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分离菌体蛋白, 出现一条高表达的诱导蛋白带, 相对分子质量为 2.3×10^4 左右 (图 5 a), 与预测的香鱼 FX 丝氨酸蛋白酶结构域相对分子质量大小 (2.26×10^4) 相符。该片段切胶纯化后免疫小鼠, 制备抗血清。

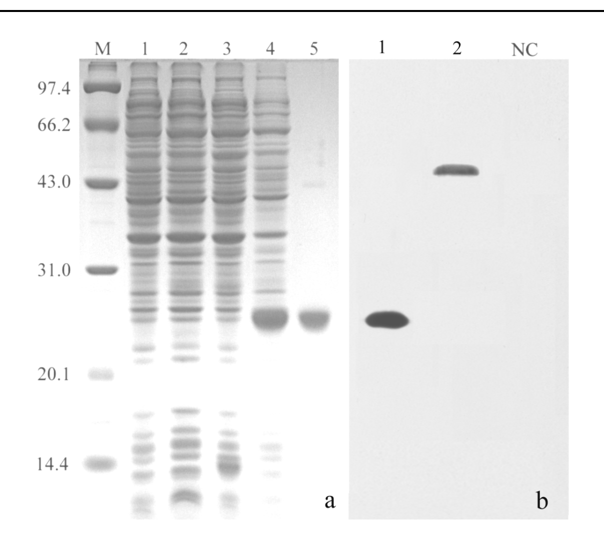


图 5　香鱼 FX 丝氨酸蛋白酶结构域原核表达和 Western blotting 分析

Fig. 5　Prokaryotic expression and Western blotting analysis of serine proteinase domain of FX

a: 香鱼 FX 丝氨酸蛋白酶结构域原核表达的 SDS-PAGE 分析。M: 蛋白 marker（$\times 10^3$); 1: 不含表达载体的 BL21 诱导; 2: 含表达载体 pSBET 的BL21诱导; 3: 含目的片段重组质粒的BL21未诱导; 4: 含重组质粒的 BL21 诱导; 5: 切胶纯化。b: Western blotting 分析。1: 原核表达纯化产物; 2: 健康香鱼血清; NC: 阴性对照。

a: SDS-PAGE analysis of serine proteinase domain expression of FX. M: protein molecular weight standards ($\times 10^3$); 1: lysis of BL21, induced with IPTG; 2: lysis of BL21 transformed with pSBET vector, induced with IPTG; 3: lysis of BL21 transformed with pSBET-FX plasmid, without IPTG induction; 4: IPTG induced serine proteinase domain of FX; 5: purified serine proteinase domain of FX. b: Western blotting analysis of recombinant product and health ayu serum. 1: purified serine proteinase domain of FX; 2: healthy ayu serum; NC: negative control.

2.5　Western blotting 检测香鱼血清中 FX 的含量变化

取 4、8、12、16、24、36 h 和对照香鱼血清蛋白进行 Western blotting 分析，在血清中检测到相对分子质量为 4.81×10^4 的条带(图 5 b)。与健康对照相比，4 h 时，鳗利斯顿氏菌侵染的香鱼血清中 FX 的含量未发生明显变化；8 h 后含量显著增加 (P<0.05)，并随着感染时间延长含量持续增加，8 h 时为对照组的 2 倍，36 h 时为对照组的 3.68 倍 (图 6)。

3　讨　论

FX 广泛存在于脊椎动物中。本实验通过文库随机测序结合 RACE 的方法，成功获得了香鱼 FX 基因 cDNA 全长序列，这是香鱼 FX 基因 cDNA 序列的首次报道。推测的编码蛋白具有 γ-羧基谷氨酸结构域、EGF-like 结构域和丝氨酸蛋白酶等动物 FX 特征性结构域，它与其它物种的氨基酸同一性小于 53%。香鱼 FX 基因 mRNA 主要在肝组织中表达，这与哺乳类等物种的报道结果一致 (Pendurthi et al, 1997; Heidtmann & Kontermann, 1998; Borensztajn et al, 2008)。氨基酸序列系统进化树分析揭示，香鱼 FX 与斑马鱼 FX 的进化相关性最高，且与其它物种 FX 的进化关系与动物本身的进化分类相吻合，揭示了 FX 在进化过程中的保守性。

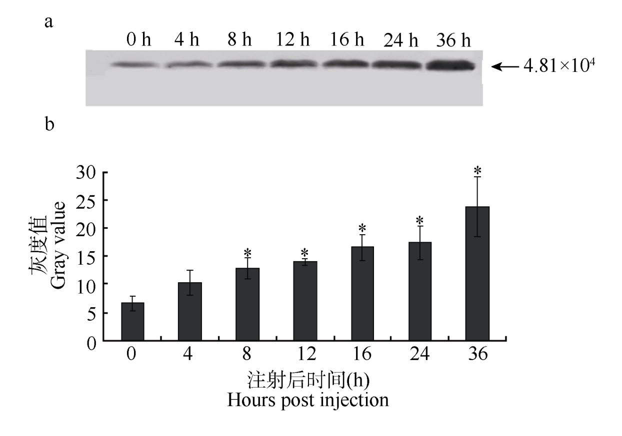


图 6　香鱼血清 FX Western blotting 检测

Fig. 6　Western blotting analysis of ayu serum

a; 各时段香鱼血清中 FX Western blotting 条带; b; Western blotting 条带灰度值分析。*显著性差异 (n=4, P<0.05)。

a; Western blotting of ayu serum from different time points; b; Gray value analysis of Western blotting. *Significant differences (n=4, P<0.05)

鳗利斯顿氏菌是养殖香鱼出血性败血症的主要病原之一，由其引起的病害给香鱼产业造成了巨大的经济损失 (Li et al, 2009)。本实验研究表明，FX 基因的 mRNA 表达及血清中 FX 的蛋白含量变化均与鳗利斯顿氏菌侵染香鱼的过程紧密相关，这在鱼类中是首次报道，揭示了 FX 很可能在鱼类抗细菌侵染的免疫反应中起作用。结合前人对哺乳动物 FX 的研究结果，我们推测鱼类 FX 在此病程中的作用如下：1) FX 作为动物内源性和外源性凝血途径共同通路的关键酶 (Krupiczojc et al, 2008)，首要功能是促进凝血 (Borensztajn et al，2008)。细菌感染的急性期反应特征之一是病原菌感染宿主动物后短时间内，宿主血液中的纤维蛋白原在凝血酶的作用下迅速形成纤维蛋白，并于炎症区组织间隙构成网状物或凝块，以阻止病原菌及其毒性产物的扩散。因此，FX 的表达上调可能起促进凝血，缓解病情的作用。我们之前对香鱼抗凝血酶 (antithrombin, AT) 基因的研究也表明，到 12 h 时，细菌侵染组香鱼的肝 AT 基因 mRNA 表达与健康组相比显著下调 (Li

et al, 2011), 已知 AT 和 FX 的作用相互拮抗。因此, 我们认为侵染前期 FX 基因 mRNA 的表达上调与 AT 基因 mRNA 的表达下调的目的是一致的, 均有利于凝血系统发挥作用。有意思的是, 两个基因 mRNA 的表达均在 16 h 时显著增加, 这可能是由于凝血和纤溶系统过度激活容易导致弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)而给机体造成严重损伤。因此, 在 FX 显著上调的同时, AT 也从前期的表达下调转变为显著上调, 两者的作用相互拮抗, 以避免凝血系统的过度激活。2) 哺乳动物研究发现, FXa 能诱导人脐静脉内皮细胞IL-6和MIF 的表达 (Cirino et al, 1997; Papapetropo ulos et al, 1998; Shimizu et al, 2004); 或参与激活补体系统 C3 (Amara et al, 2008)。一些鱼类研究也表明病原菌感染后, IL-6、C3 和 MIF 的表达量均上调 (Bird et al, 2005; Chen et al, 2008; Wang, 2010), 我们抑制消减杂交的结果也表明鳗利斯顿氏菌侵染 8 h 后, 香鱼肝组织中补体系统成分, 如 C4、C5、C8、C9、Cfh、Cfb 等基因 mRNA 均显著表达上调 (结果未发表)。然而, 鱼类 FX 是否介导病原菌感染后上述细胞因子及补体系统成分的表达增加尚有待于进一步证明。

综上所述, 本研究首次报道了鱼类凝血因子 X 基因表达与鳗利斯顿氏菌感染的相关性, 为鱼类 FX 的结构、功能和作用机制的深入研究奠定了基础。

参考文献:

Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M. 2008. Interaction between the coagulation and complement system[J]. *Adv Exp Med Biol*, **632**: 71-79.

Bird S, Zou J, Savan R, Kono T, Sakai M, Woo J, Secombes C. 2005. Characterisation and expression analysis of an interleukin 6 homologue in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*[J]. *Dev Comp Immunol*, **29** (9): 775-789.

Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. 2008. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease[J]. *Trends Mol Med*, **14**(10): 429-440.

Borensztajn K, Spek CA. 2011. Blood coagulation factor Xa as an emerging drug target[J]. *Expert Opin Ther Targets*, **15**(3): 341-349.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, **72**(1-2): 248-254.

Chen J, Shi YH, Li MY, Ding WC, Niu H. 2008. Molecular cloning of liver angiotensinogen gene in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and mRNA expression changes upon *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Fish She llfish Immunol*, **24**(5): 659-662.

Chen Y, Guo L, Chen SF. 2008. Expression analysis on C3, C4 of *Takifugu obscurus* after injection[J]. *Jiangsu Agric Sci* , **2**: 175-177.[陈勇, 郭丽, 陈舒泛. 2008. 感染后暗纹东方鲀补体组分 C3、C4 表达分析. 江苏农业科学, **2**: 175-177.]

Cirino G, Cicala C, Bucci M, Sorrentino L, Ambrosini G, DeDominicis G, Altieri DC. 1997. Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation. Molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor-1 induces acute inflammation in vivo[J]. *J Clin Invest*, **99**(10): 2446-2451.

Heidtmann HH, Kontermann RE. 1998. Cloning and recombinant expression of mouse coagulation factor X[J]. *Thromb Res*, **92**(1):33-41.

Jima DD, Shah RN, Orcutt TM, Joshi D, Law JM, Litman GW, Trede NS, Yoder JA. 2009. Enhanced transcription of complement and coagulation genes in the absence of adaptive immunity[J]. *Mol Immunol*, **46**(7): 1505-1516.

Kimura A, Lkeo K, Nonaka M. 2009. Evolutionary origin of the vertebrate blood complement and coagulation systems inferred from liver EST analysis of lamprey[J]. *Dev Comp Immunol*, **33**(1): 77-87.

Krupiczojc MA, Scotton CJ, Chambers RC. 2008. Coagulation signalling following tissue injury: Focus on the role of factor Xa[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, **40**(6-7): 1228-1237.

Leong JS, Jantzen SG, von Schalburg KR, Cooper GA, Messmer AM, Liao NY, Munro S, Moore R, Holt RA, Jones SJ, Davidson WS, Koop BF. 2010. *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome [J]. *BMC Genomics*, **11**: 279.

Li CH, Chen J, Shi YH, Li MY. 2009. Characterization of *Listonella anguillarum* as the aetiological agent of vibriosis occurred in cultured ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Ninghai country, China [J]. *Acta Micriobiol Sin*, **49**(7): 931-937.[李长红, 陈炯, 史雨红, 李明云. 2009. 宁海地区香鱼弧菌病病原菌鉴定. 微生物学报, **49**(7): 931-937.]

Li CH, Chen J, Shi YH, Lu XJ. 2011. Cloning, sequence analysis and mRNA expression Pattern of antithrombin gene (*AT*) in ayu (*Plecoglossus altivelis*) [J]. *J Agric Biotechnol*, **19**(1): 157-163. [李长红, 陈炯, 史雨红, 陆新江. 2011. 香鱼抗凝血酶基因 (*AT*) cDNA 的克隆、序列分析及组织表达特征. 农业生物技术学报, **19**(1): 157-163]

Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C(T)) method [J]. *Methods*, **25**(4): 402- 408.

Papapetropoulos A, Piccardoni P, Cirino G, Bucci M, Sorrentino R, Cicala C, Johnson K, Zachariou V, Sessa WC, Altieri DC. 1998. Hypotension and inflammatory cytokine gene expression triggered by factor Xa–nitric oxide signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**(8): 4738-4742.

Pendurthi UR, Anderson KD, James HL. 1997. Characterization of a full-length cDNA for rabbit factor X[J]. *Thromb Res*, **85**(6): 503-514.

Pierre L St, Masci PP, Filippovich I, Sorokina N, Marsh N, Miller DJ, Lavin MF. 2005. Comparative analysis of prothrombin activators from the venom of Australian elapids[J]. *Mol Biol Evol*, **22**(9): 1853-1864.

Schoenmakers SH, Reitsma PH, Spek CA. 2005. Blood coagulation factors as inflammatory mediators[J]. *Blood Cells Mol Dis*, **34**(1): 30-37.

Shimizu T, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Honda A, Ishibashi T, Shimizu H. 2004. Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, **279**(14): 13729-13737.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, **24**(8): 1596-1599.

Uenobe M, Kohchi C, Yoshioka N, Yuasa A, Inagawa H, Morii K, Nishizawa T, Takahashi Y, Soma G. 2007. Cloning and characterizationof a TNF-like protein of *Plecoglossus altivelis* (ayu fish)[J]. *Mol Immunol*, **44**(6): 1115-1122.

Wang QL. 2010. Effects of macrophage migration inhibitory factor(MIF) in fish bacterial sepsis[D]. Zhejiang University. [王渠龙. 2010. 巨噬细胞移动抑制因子在鱼类细菌性败血症中的生物学作用. 浙江大学]